云 南 植 物 研 究 2000，22（1）：65～70
Acta Botanica Yunnanica

水母雪莲愈伤组织培养和黄酮类化合物的形成*

李茂寅[1]，赵德修[1**]，邢建民[1,2]，赵丽丽[3]

（[1] 中国科学院植物研究所，北京 100093）

（[2] 中国科学院化工冶金研究所，北京 100080）

（[3] 河南省商丘市卫校，河南 商丘 476100）

摘要：8 种基本培养基对水母雪莲（*Saussurea medusa* Maxim）愈伤组织生长和黄酮类形成影响不同，MS 培养基较有利于愈伤组织生长和黄酮类形成。碳源、氮源、植物激素对愈伤组织生长和黄酮类形成影响较为显著。从 MS 培养基修饰得到的 M－13 培养基培养的愈伤组织生长量和黄酮类产量比原培养基分别提高 33％和 82％，达到 21.00 gDW/L 和 1.89 g/L。通过 TLC 和 HPLC 初步分析和鉴定，证明 M－13 培养基上培养的愈伤组织能够形成 2 种有效黄酮类成分金合欢素（jaceosidin）和高车前素（hispidulin），其含量分别占黄酮类的 22％～24％和 0.15％～0.17％，这种百分率与 MS 培养基培养下的 2 种黄酮没有明显差异。

关键词：水母雪莲；愈伤组织培养；黄酮类化合物

中图分类号：Q 945　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0253－2700(2000)01－0065－06

Callus Culture and Flavonoids Production of *Saussurea medusa* *

LI Mao－Yin[1]，ZHAO De－Xiu[1**]，XING Jian－Min[1,2]，ZHAO Li－Li[3]

([1] *Institute of Botany*，*The Chinese Academy of Sciences*，Beijing 100093)

([2] *Institute of Chemical Metallurgy*，*The Chinese Academy of Sciences*，Beijing 100080)

([3] *Medical College of Shangqiu*，*Henan Province*，Shangqiu 476100)

Abstract：Effects of eight basic media on callus growth and flavonoids production of *Saussurea medusa* were different. MS medium was rather suitable for callus growth and flavonoids production. Carbon source，nitrogen source and plant hormone had the obvious effects on the callus growth and flavonoids production. The maximum callus yield and flavonoids production in the M－13 medium modified from MS medium reached 21.00 g DW/L and 1.89 g/L，and increased 33％ and 82％ than those in MS medium respectively. The results of preliminary identification by TLC and HPLC methods demonstrated that the callus cultured on both M－13 medium and MS medium had the capability to synthesize jaceosidin and hispidulin. The percentages of jaceosidin and hispidulin in the flavonoids were 22％～24％ and 0.15％～0.17％ respectively，but they were not very different between the callus cultured on MS medium and M－13 medium.

Key words：*Saussurea medusa*；Callus Culture；Flavonoids

水母雪莲（*Saussurea medusa* Maxim）属于菊科（Compositae）风毛菊属（*Saussurea*

* 基金项目：国家自然科学基金资助资助（39570862）。Supported by the National Natural Science Foundation of China.

** 通讯联系人。Author for correspondence. E－mail address：zhaodx @bj.col.com.cn

收稿日期：1999－01－26，1999－05－20 接受发表

DC）植物，分布于我国青海、甘肃、西藏等地，是我国高山地区常用的一种名贵药材，具有散寒除湿，活血通络，抗癌，抗炎，抗疲劳等功效，可治疗风湿性关节炎，妇女月经不调，痈疮肿毒，高山不适应等症（李观海等，1980）。

雪莲含多种有效提取物，其中黄酮类为主要成分，如用来治疗偏瘫的雪莲通脉丸（梁文生等，1996）和雪莲注射液（王本富等，1996），都是以黄酮类含量为质量标准的，其中有效成分高车前素和金合欢素对治疗腹水型肝癌、消除自由基、抗疲劳有良好效果（韩书亮，1995）。然而天然雪莲生长环境特异而且缓慢，人工栽培困难，加之长期的掠夺性采挖，已使得雪莲成为濒危物种。应用植物细胞大量培养技术开发雪莲具有良好的应用前景，这对满足临床上对雪莲有效成分的需求，保护濒危物种具有重要意义。雪莲花原植物均可同等入药（连文琰等，1985），我们选择水母雪莲作为实验材料，并通过目视法和物理诱变法筛选得到高产黄酮细胞系（赵德修等，1998a），而且对影响水母雪莲愈伤组织生长和黄酮类形成的不同理化因子进行了初步研究（赵德修等，1998b）。在此基础上，本文对水母雪莲愈伤组织生长及黄酮类形成的最佳条件进行了探索，为通过水母雪莲细胞的发酵培养生产黄酮类有效成分奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料 采用本实验室诱导得到的水母雪莲（*Saussurea medusa*）高产黄酮细胞系（赵德修等，1998a）。

1.2 培养方法 愈伤组织在25±1℃下培养。50 mL三角瓶装20 mL 6%琼脂固化的培养基。接种量为3.5 g DW/L。光照条件为40 W白色荧光灯连续光照，辐照强度为60 μmol.$m^{-2}s^{-1}$。**2.1**中的各种基本培养基均添加0.5 mg/L BA，2 mg/L NAA和30 g/L蔗糖。对愈伤组织生长与黄酮类形成较好的培养基类型和培养基中的组分一旦得出，下面的实验就立即采用。

1.3 愈伤组织生长测定 按赵德修等（1998a）的方法。

1.4 黄酮类含量测定的紫外分光光度法、薄层层析法、高压液相色谱法 按赵德修等（1998b）的方法。

2 结果与讨论

2.1 不同基本培养基对水母雪莲愈伤组织生长及黄酮类形成的影响

不同种类的基本培养基对植物培养细胞的生长和次生代谢产物的形成有很大的影响。例如紫草细胞在White培养基上能够合成紫草宁衍生物，而在LS等培养基上就不能合成（Fujita等，1981）；又如，在MS、MC、B_5、LS、6，7－V、White培养基中，MC培养基对红花愈伤组织生长和α－生育酚的形成最有效（甘烦远等，1991）。在对水母雪莲愈伤组织生长及黄酮类形成影响的实验中，我们选择了8种基本培养基：White、Nitsch、B_5、MS、H、T、Miller培养基（孙敬三等，1995）和FPM培养基（Seo等，1993）。结果表明（图1）：对愈伤组织生长最有利的基本培养基是MS，其次是T、Miller、H、FPM、B_5、Nitsch、White。而对黄酮类形成最有利的基本培养基也是MS，其次是Miller、T、H、FPM、Nitsch、B_5、White。因此，MS是进行水母雪莲愈伤组织培养形成黄酮类化合

物的最佳培养基。

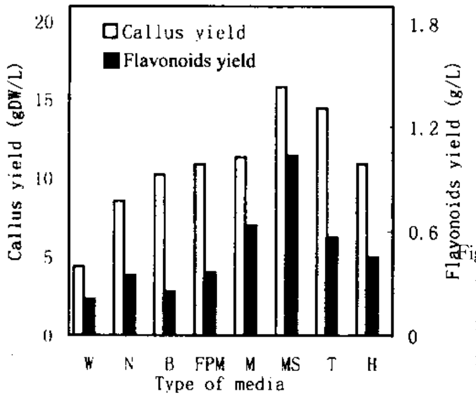
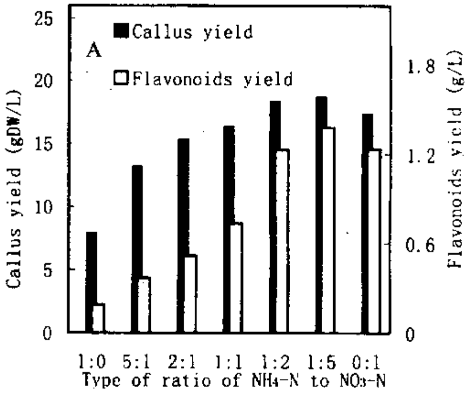


图 1　不同基本培养基对水母雪莲愈伤组织培养的影响

Fig.1.　Effects of different basic media on callus cultures of *S. medusa*. W：White medium，N：Nitsch medium，B：B_5 medium，FPM：FPM medium，M：Miller medium，MS：MS medium，T：T medium，H：H medium

2.2　MS 培养基中无机成分对水母雪莲愈伤组织生长及黄酮类形成的影响

在 MS 培养基的无机成分中，氮源对愈伤组织生长和黄酮类形成的影响最为明显。当氨态氮与硝态氮比例相同时，氯化氨和硝酸钾为氮源比硝酸铵和硝酸钾为氮源较有利于愈伤组织生长和黄酮类形成。总氮的浓度对愈伤组织生长和黄酮类形成也有较大影响，如图 2 B 表明，总氮浓度为 0.04 mmol/L 时愈伤组织生长量和黄酮类产量最高，分别达到 18.82 g DW/L 和 1.33 g/L，是其它浓度下的 1.1～4.2 倍和 1.1～8.4 倍；当总氮浓度为 0.24 mmol/L 时，愈伤组织生长量和黄酮类产量降低显著，只是前者浓度时的 24% 和 12%。愈伤组织生长和黄酮类形成还受到氨态氮与硝态氮比例的影响。随着硝态氮所占比例增高，愈伤组织生长量和黄酮类产量也很快上升（图 2：A），当氨态氮与硝态氮比例为 1∶5 时，愈伤组织生长量和黄酮类产量最高，是其它比例下的 1.0～2.4 倍和 1.1～7.2 倍。这种氨态氮与硝态氮比例影响黄酮类成分形成的研究结果与 Yamakawa 等人（1983）报道的结果基本上是一致的。



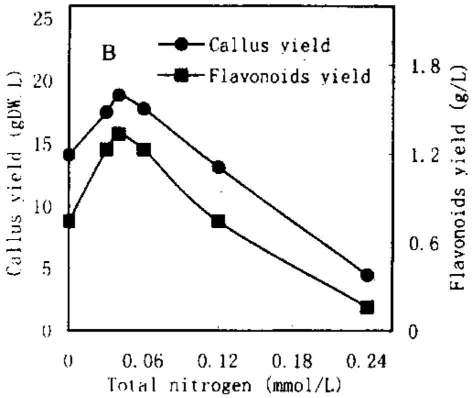


图 2　氮源对水母雪莲愈伤组织培养的影响

Fig.2.　Effects of ammonium and nitrate on callus cultures of *S. medusa*. Ammonium chloride and potassium nitrate were used as inorganic nitrogen sources. The ratio of ammonium to nitrate was 1∶5 in Fig 2B. Total concentration of inorganic nitrogen was 0.04 mmol/L in Fig 2A. The ratio of ammonium to nitrate and the total concentration of inorganic nitrogen in MS medium were 1∶2 and 0.06 mmol/L respectively.

MS培养基无机成分中的其它组分对愈伤组织生长和黄酮类形成也有不同程度的影响，其较适浓度见表4。

2.3 MS培养基中有机成分对水母雪莲愈伤组织生长及黄酮类形成的影响

在MS培养基的有机成分中，碳源对雪莲愈伤组织生长和黄酮类形成影响显著（表1）：以蔗糖为唯一碳源时，30 g/L的蔗糖浓度既有利于愈伤组织生长又有利于黄酮类形成，其黄酮类产量分别是10 g/L和45 g/L蔗糖浓度的3.3倍和1.9倍。当蔗糖与葡萄糖组合时，30 g/L蔗糖+10 g/L葡萄糖的组合得到最高的黄酮类产量，达到1.75 mg/L，是其它组合的1.2～8.8倍。当总糖浓度高于50 g/L时，黄酮类形成受到强烈抑制。甘氨酸、维生素B_1、维生素B_6、烟酸、肌醇对雪莲愈伤组织生长和黄酮类形成也有影响，选用的较适浓度见表4。

表1 不同碳源组合对水母雪莲愈伤组织培养的影响

Table 1 Effects of different combinations of carbon sources on callus cultures of *S. medusa*

葡萄糖 Glucose (g/L)	蔗糖 Sucrose (g/L)					
	15		30		45	
	Callus yield (g/L)	Flavonoids yield (g/L)	Callus yield (g/L)	Flavonoids yield (g/L)	Callus yield (g/L)	Flavonoids yield (g/L)
0	9.88	0.43	17.96	1.43	17.44	0.76
10	11.46	0.75	19.45	1.75	19.50	0.83
20	18.93	1.37	17.14	0.72	18.40	0.45
30	21.55	1.45	15.82	0.31	11.07	0.20

2.4 植物激素对水母雪莲愈伤组织生长及黄酮类形成的影响

Meyer等（1995）发现，生长素影响 *Oxalis linearis* 培养细胞生长和花色苷形成，生长素对雪莲愈伤组织生长和黄酮类形成也有很大影响（表2）。在BA（0.1 mg/L）的情况下，随着2,4-D浓度的升高（0.01～1.00 mg/L），愈伤组织生长和黄酮类形成受到抑制，相反，随着NAA浓度的升高（0.01～1.00 mg/L），愈伤组织生长量和黄酮类产量有所增加。NAA 1.00 mg/L与2,4-D 0.01 mg/L相比，虽然对愈伤组织生长的影响差异不大，但前者更有利

表2 不同种类的生长素对水母雪莲愈伤组织培养的影响

Table 2 Effects of auxin on callus cultures of *S. medusa*

2，4－D (mg/L)	NAA (mg/L)	BA (mg/L)	Callus yield (g/L)	Flavonoids content (mg/gDW)	Flavonoids yield (g/L)
0.01	0.00	0.10	15.48	26.49	0.41
0.10	0.00	0.10	8.20	3.39	0.03
1.00	0.00	0.10	6.90	2.84	0.02
0.00	0.01	0.10	7.44	34.95	0.26
0.00	0.10	0.10	15.60	35.90	0.56
0.00	1.00	0.10	15.89	50.97	0.81

于黄酮类形成，其黄酮类产量是后者的近两倍。当 NAA 与 BA 组合时（表 3），NAA 2 mg/L + BA 0.5 mg/L 的组合使得黄酮类产量最高，是其它组合的 1.1～2.3 倍。

表 3　NAA 和 BA 组合对水母雪莲愈伤组织培养的影响

Table 3　Effects of combinations of NAA with BA on callus cultures of S. medusa

NAA (mg/L)	BA (mg/L)					
	0.1		0.5		1.0	
	Callus yield (g/L)	Flavonoids yield (g/L)	Callus yield (g/L)	Flavonoids yield (g/L)	Callus yield (g/L)	Flavonoids yield (g/L)
1.0	16.05	0.82	16.60	1.32	17.77	1.02
2.0	16.89	1.21	21.08	1.89	21.78	1.68
3.0	16.81	0.85	19.72	1.54	18.76	0.93

2.5　M－13、MS 培养基对水母雪莲愈伤组织生长及黄酮类形成影响的差异

表 4　MS 培养基和 M－13 培养基成分比较

Table 4　Compositions of MS medium and M－13 medium

	MS medium mg/L	M－13 medium mg/L		MS medium mg/L	M－13 medium mg/L
NH_4NO_3	1650	—	KI	0.83	—
NH_4Cl	—	357	$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25	0.25
KNO_3	1900	3367	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025	0.05
KH_2PO_4	170	170	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025	—
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370	370	sucrose	30000	30000
$CaCl_2$	440	220	glucose	—	15000
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27.85	18.57	glycine	2	1
Na_2－EDTA	37.25	24.83	thiamine·HCl	0.4	0.4
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	22.3	11.15	pyridoxine·HCl	0.5	0.25
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8.6	10	nicotinic acid	0.5	0.5
H_3BO_3	6.2	6.2	inositol	100	100

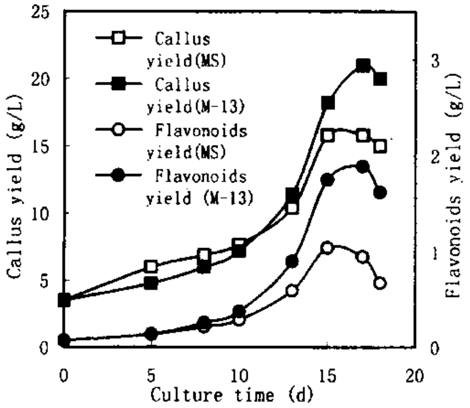


图 3　水母雪莲愈伤组织在 MS 和 M－13 培养基中生长及黄酮类形成动态

Fig.3　Curves of callus growth and flavonoids production of *S. medusa* cultured on MS medium and M－13 medium. The compositions of M－13 medium were indicated in table 4.

通过对 MS 培养基中的组分对雪莲愈伤组织生长和黄酮类形成影响的逐一调查，发现影响较大的因子是氮源、碳源和植物激素。MS 修饰后得到 M－13 培养基（表 4）。较利

于雪莲愈伤组织生长和黄酮类形成的 M－13 **培养基的特点是氨态氮源浓度较低、硝态氮源浓度较高、钙盐与铁盐浓度较低、锌盐与铜盐浓度较高。在** MS、M－13 **培养基上愈伤组织生长和黄酮类形成动态相似（图** 3）。**愈伤组织在** MS－13 **培养基上第** 16 d **达到生长和黄酮类合成的最高点，比** MS **培养基晚一天。培养** 16 d **以后，**2 **种培养基上的愈伤组织都开始逐渐有不同程度的褐化死亡，并且黄酮类含量很快下降。雪莲愈伤组织生长量和黄酮类产量在** M－13 **培养基上比** MS **培养基上分别高** 1.33 **倍和** 1.82 **倍，达到** 21.00 g DW/L **和** 1.89 g/L。

2.6 培养物中活性产物分析

HPLC **对培养物中金合欢素和高车前素的分析和含量测定：**MS **培养基和** M－13 **培养基上的愈伤组织中这** 2 **种黄酮占黄酮类的百分率没有明显差异，分别为** 22%～24% **和** 0.15%～0.17%。

TLC **法鉴定金合欢素和高车前素：**3 **种不同展开剂的** Rf **值与标准品对照完全一致。**

致谢　标准品由兰州大学化学系贾忠建教授提供。

参 考 文 献

王本富，路杰，关家彦，1996. **天山雪莲注射液提取工艺的考察**〔J〕. **中国药学杂志，31**（5）：299～301

甘烦远，郑光植，1991. **红花愈伤组织的诱导、生长及其** α－**生育酚的产生**〔J〕. **云南植物研究，13**（2）：189～195

李观海，刘发，赵荣春，1980. **雪莲对大鼠实验性关节急性炎症的作用**〔J〕. **药学学报，15**：368～370

孙敬三，桂耀林，1995. **植物细胞工程实验技术**〔M〕. **北京：科学出版社，**403～408

连文琰，肖培根，1985. **雪莲花原植物的调查整理**〔J〕. **中药材，6**：19

赵德修，乔传令，汪沂，1998a. **水母雪莲的细胞培养和高产黄酮细胞系的筛选**〔J〕. **植物学报，40**：515～520

赵德修，汪沂，赵敬芳，1998b. **不同理化因子对雪莲培养细胞中黄酮类形成的影响**〔J〕. **生物工程学报，14**（3）：259～264

梁文生，柴进，1996. **雪莲通脉丸治疗偏瘫** 82 **例报告**〔J〕. **江苏中医，17**（1）：14

韩书亮，1995. **大苞雪莲四种成分抗癌作用研究**〔J〕. **癌变·畸变·突变，7**：80－83

Fujita Y，Hara Y，Suga C *et al*，1981. Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*〔J〕. *Plant Cell Rep*，**1**：61～63

Meyer H J，Van Staden J，1995. The *in vitro* production of an anthocyanin from cell cultures of *Oxalis linearis*〔J〕. *Plant Cell*，*Tissue*，*Organ Cult*，**40**：55～58

Seo W T，Park Y H，Choe T B，1993. Identification and production of flavonoids in a cell suspension culture of *Scutellaria baicalensis* G〔J〕. *Plant Cell Rep*，**12**：414～417

Yamakawa T，Kato S，Ishida K *et al*，1983. Production of anthocyanins by *Vitis* cells in suspension culture〔J〕. *Agric Biol Chem*，**47**（10）：2185～2191